尖吻蝮蛇毒凝血样酶的纯化、性质及其萤光光谱

王 淳 崔 涛 刘 兢 黄婉治 鲁子贤*
（中国科学技术大学生物系，合肥）

摘 要

徐洵等用DEAE-Sephadex A-50将尖吻蝮蛇毒分离成十二个组份。经证明第十组份有凝血样酶活性。将此组份经Sephadex G-75、DE52柱进一步分离得到没有完全分开但都有凝血样酶活性的两个峰。用聚丙烯酰胺凝胶电泳检查，均为一条带。SDS凝胶电泳测分子量都在30,000左右，免疫扩散图谱显示二者不形成交叉沉淀线，说明这二个组份是很不专一的凝血样酶。最适pH为7.4，等电点接近4。

研究组份Ⅰ的自身萤光光谱，在中性缓冲液中与牛凝血酶自身萤光光谱比较，有所不同。表明这两个酶在构象上是有差异的。凝血样酶在pH 2—9范围内与色氨酸比较，萤光光谱峰没有位移，活性变化伴随着萤光强度强弱变化。变温时凝血样酶萤光强度曲线与色氨酸变温曲线接近。凝血样酶活性不被肝素抑制，表现在其萤光强度基本不变。

很久以来，人们就注意到了蛇毒的凝血效应，并发现了蛇毒的凝血作用是由于凝血样酶的存在。自从Esnouf等人[1]首先从泰国蝮蛇（*Agkistrodon rbodotoma*）毒液分离纯化到具有凝血样酶活性组份以后，许多国家学者陆续在蝮蛇属（*Agkistrodon*）、蝰属（*Crotalus*）、矛头蝮蛇属（*Bothrops*）、响尾蛇属（*Crotalus*），以及竹叶青蛇属（*Trimeresurus*）中均分离得到凝血样酶的活性组份。本文报导了中国皖南山区尖吻蝮蛇（*A.acutus*）蛇毒凝血样酶的纯化、性质及其萤光光谱。

一、材料与方法

材料 五步蛇毒，安徽省祁门蛇伤所提供；Sephadex G-75，瑞典Pharmacia产品；DEAE-纤维素，Whatman DE_{52}微粒型；牛凝血酶，上海生物制品所产品；五步

* 兼职，永久通讯地址：中国科学院上海生物化学研究所。

蛇抗毒素、纤维蛋白原，上海生物制品所产品；肝素，上海生物制药厂产品；对甲苯磺酰精氨酸甲酯（TAME），上海生化研究所制品；标准蛋白质、卵白蛋白、胰蛋白酶、核糖核酸酶、细胞色素*C*、均为上海生化研究所产品；牛血清白蛋白，英国Light产品；其它化学试剂均为国产分析纯级。

Sephadex G-75柱层析　3×100厘米Sephadex G-75柱，用0.15*M* NaCl溶液平衡并洗脱，流速为42毫升/小时，洗脱液用我系自己设计制造的80型核酸蛋白检测仪检测。

DE_{52}柱层析　装柱1.5×40厘米，用0.01*M*硼酸缓冲液 pH9.0平衡。上样后，用0～0.5*M* NaCl直线浓度梯度洗脱，流速30毫升/小时。

聚丙烯酰胺凝胶电泳　用碱性凝胶系统，凝胶浓度7%，电泳缓冲液0.5*M* Tris-甘氨酸，pH8.3，电泳后用0.25%考马斯兰染色。

凝血样酶活性

凝固活性：用Markland对Magnusson的改良法[2]

酯酶活性：TAME法[3]酯酶活性1单位为：在37°C，30分钟水解1微克分子TAME所需的蛇毒量。

分子量测定　用SDS凝胶电泳法[4]。

琼脂免疫扩散　1%琼脂糖，pH7.2磷酸缓冲液溶解后铺成2.5×8厘米板，等距离打孔加样，湿室扩散24小时，观察结果。

等电点测定　按照荞克强等人方法[5]稍加改进。

氨基酸组成　样品用5.7*N* HCl在110°C水解24小时后，用日本HITACHI 835-50氨基酸分析仪分析。

荧光光谱分析　用日本岛津RF-520型双光束差光谱荧光分光光度计，样品浓度25微克/毫升。

二、结　果

徐洵等人[6]用DEAE-Sephadex A-50将五步蛇粗毒分离得到十二个组份，见图1。第十个组份除有很低的出血活性外，表现出很强的凝血样酶活性。将此组份对蒸馏水透析冻干，在Sephadex *G*-75柱上再层析，得到三个峰，如图2所示。仅峰Ⅰ有凝血样酶活性，用盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳检查，电泳图谱上显示峰Ⅰ是由靠得很近的两条带组成，见图3。考虑此组份尚不纯，而且在带电荷上有差异，用DE_{52}柱进一步分离得到两个峰，但并没有完全分开，分别称为组份Ⅰ和组份Ⅱ，见图4。取组份Ⅰ的前一部分和组份Ⅱ的后一部分，发现均有凝血酶活力。在聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈一条纯化的带。如图5所示。用SDS凝胶电泳测定它们的分子量，结果表明，组份Ⅰ约32,000，组份Ⅱ约33,000左右。蛋白质分子量对数对相对迁移率的曲线见图6。将组份Ⅰ、Ⅱ以及组份Ⅰ、Ⅱ的混合峰的样品用免疫扩散检测，从图7的免疫扩散图谱上可以清楚看到，组份Ⅰ、Ⅱ以及混合样品产生免疫沉淀条纹，这些沉淀条纹的接头处是圆滑的。纯化后的组份Ⅱ氨基酸组成见表1，并与Ouyang等人[7]报道的台湾地区五步蛇毒凝血样酶氨

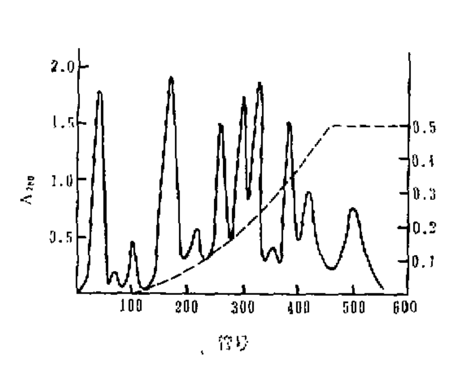


图 1　五步蛇粗毒DEAE-Sephadex A-50柱层析图谱

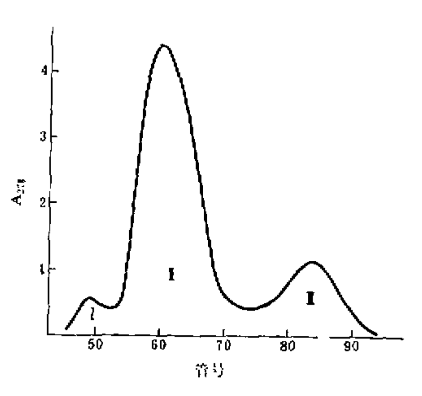


图 2　Sephadex G-75分离凝血样酶层析图，凝血酶活性部分在峰Ⅱ

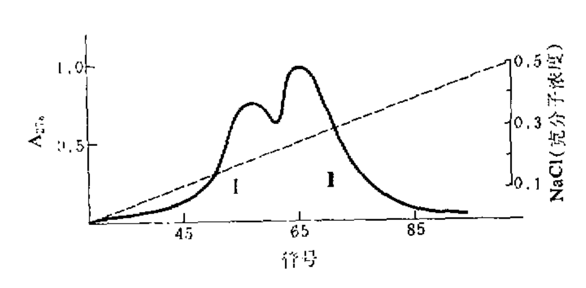


图 4　DE_{52}柱进一步分离凝血样酶组份层析图

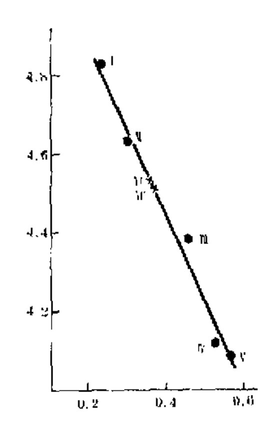


图 6　SDS凝胶电泳测分子量

Ⅰ牛血清白蛋白，　Ⅱ卵白蛋白，　Ⅲ胰蛋白酶，
Ⅳ核糖核酸酶，　Ⅴ细胞色素c，　Ⅵ组份Ⅰ，
Ⅶ组份Ⅱ

基酸比较，除了色氨酸没测定外，它们均由17种氨基酸组成，但各氨基酸的量是有差别的。

表I 凝血样酶的氨基酸组成

氨基酸	皖南山区五步蛇毒凝血样酶组份Ⅱ	台湾地区五步蛇凝血样酶[7]
天冬氨酸	23	24
苏氨酸	10	9
丝氨酸	19	7
谷氨酸	28	18
甘氨酸	17	10
丙氨酸	10	7
半胱氨酸	未测定	15
缬氨酸	13	7
甲硫氨酸	1	5
异亮氨酸	5	8
亮氨酸	18	11
酪氨酸	7	14
苯丙氨酸	10	7
赖氨酸	17	15
组氨酸	3	10
精氨酸	6	10
脯氨酸	6	10
色氨酸	未测定	
总氨基酸数	194	187

凝血样酶的等电点接近于4，最适pH在7.4。

在pH7.4的磷酸缓冲液中，研究了组份Ⅱ的自身萤光光谱，并与牛凝血酶自身萤光光谱比较，二者的激发光谱与发射光谱图见图8。

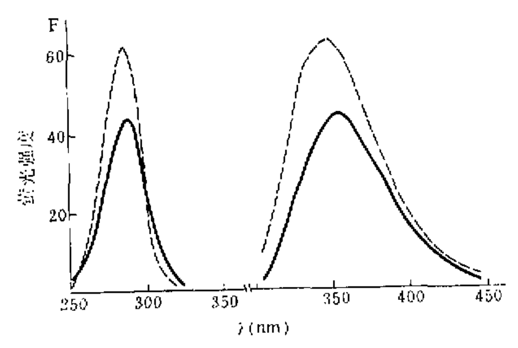
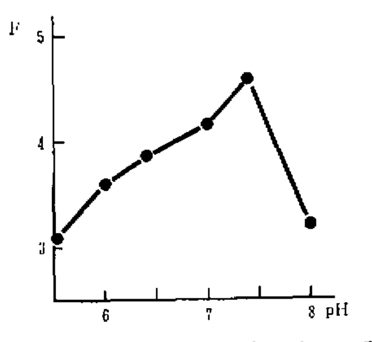


图8 凝血样酶与牛凝血酶自身萤光光谱图

实线，凝血样酶；虚线，牛凝血酶。图左为激发光谱，凝血样酶$\lambda_{max}=287$，牛凝血酶$\lambda_{max}=285$；图右为发射光谱，凝血样酶$\lambda_{max}=353$，牛凝血酶$\lambda_{max}=344$

凝血样酶的最适pH为7.4，凝血样酶的活性的增高或降低，也伴随着萤光强度的相应增强或减弱，如图9所示。色氨酸的萤光光谱在不同pH环境中，激发谱和发射谱的最大峰值均发生红移，如图10。而凝血样酶则未观察到此现象。



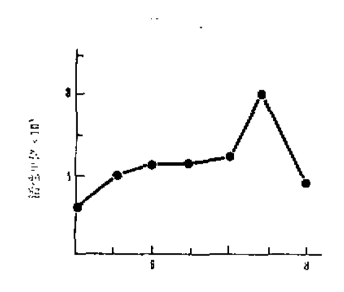


图 9　Ⅰ pH对凝血样酶酯酶活性影响　　Ⅱ pH对凝血样酶萤光强度影响

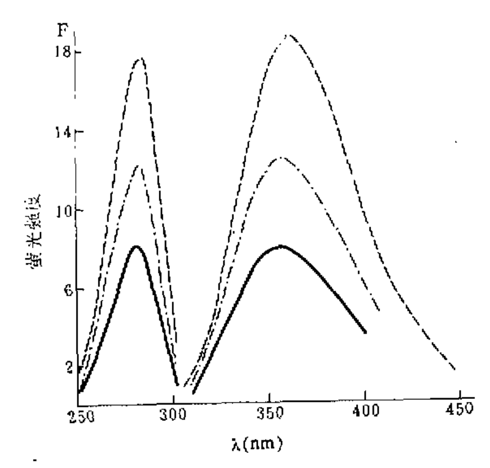


图10　不同pH值时，色氨酸的萤光光谱

—— pH＝2.6，激发光谱λ_{max}＝282nm　　发射光谱λ_{max}＝355nm

-·-·- pH＝7，激发光谱λ_{max}＝283nm　　发射光谱λ_{max}＝357nm

······ pH＝9，激发光谱λ_{max}＝284nm　　发射光谱λ_{max}＝363nm

凝血样酶变温时的萤光强度曲线与色氨酸变温曲线接近。见图11。同时没有表现出突变情况。凝血样酶的升温和降温恢复曲线不能重迭。

凝血样酶不被肝素所抑制，图12的结果也说明，在加肝素后的凝血样酶的萤光强度基本不变。

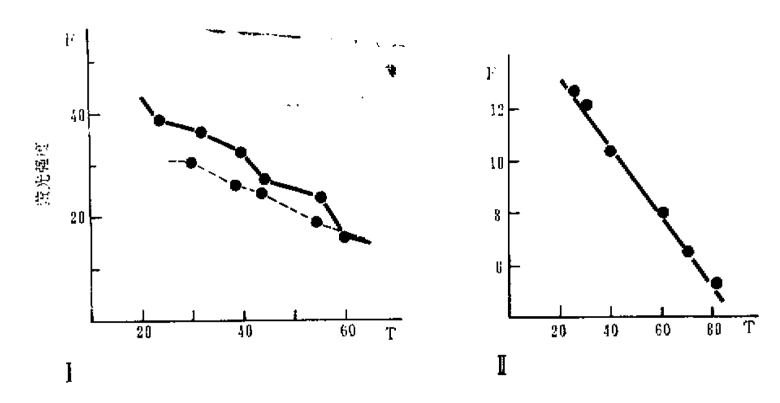


图11 Ⅰ凝血样酶荧光强度随温度（T）变化的曲线

——为升温曲线，……为降温曲线　　Ⅱ色氨酸荧光强度随温度变化曲线

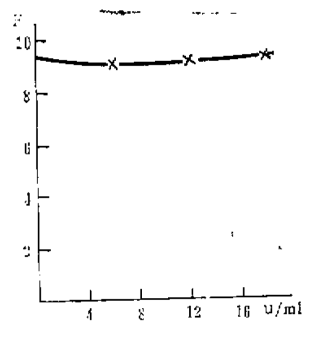


图12 肝素（单位/毫升）对凝血酶荧光强度影响

三、讨 论

用DEAE-Sephadex A-50将五步蛇毒分离成十二个组份，第十个组份除有很低的出血活性外，表现出很强的凝血样酶活性。将此组份在Sephadex G-75柱上再层析，得到三个峰，仅峰Ⅱ有凝血样酶活性。用聚丙烯酰胺盘电泳检测，显示两条靠得很近的带。用DE52柱分离得到没有完全分开的两个组份。按图4所示的收集方法，得到的组份用聚丙烯酰胺凝胶电泳检查，均为纯化了的一条带，而且都有凝血样酶活力。免疫扩散图谱上显示二者不形成交叉沉淀线，说明这两个组份并无免疫性质上的差别，从而表明它们是高度相似的凝血样酶。这两个组份在分子量上又是如此相近，就不可能是解离聚合体系，故二者的关系尚需进一步研究。

皖南山区五步蛇毒凝血样酶的氨基酸组成与台湾地区五步蛇毒凝血样酶的氨基酸组成大至相同。各氨基酸残基含量有差异，虽然台湾地区五步蛇凝血样酶含量最高的天冬氨酸与我们得到的凝血样酶中天冬氨酸含量一致，但后者含量最高的是谷氨酸。整个蛋白质酸性氨基酸含量丰富，故凝血样酶是一个酸性蛋白质。它的等点电接近于4也是与此相符合的。氨基酸的总量仅占凝血样酶总重量的70%。表明凝血样酶还有非肽链物质。

研究组份Ⅱ的自身萤光光谱，在中性磷酸缓冲液中，其激发光谱峰在287nm，发射光谱峰在353nm，这是色氨酸侧链的萤光光谱。因此说明该蛋白质含色氨酸。牛凝血酶自身萤光光谱的激发光谱峰在285nm，发射光谱峰在344nm，表明这两个酶在构象上是有差异的。

色氨酸的量子产率对其功能基团的电离程度是灵敏的。pH值对它的量子产率影响

很大。(见表 2)在不同pH值情况下，色氨酸带电情况不同而使激发光谱和发射光谱峰值略有差别，从我们得到的实验结果图10可以看到，在pH2.5～9范围内，色氨酸的激发光谱和发射光谱最大峰值均发生了红移。而且萤光强度呈直线上升趋势，这与理论上是

表 2　　不同pH值时，色氨酸的量子产率

pH	色氨酸结构	量子产率	备注
10.9	H_2N-R-Coo^-	0.51	R为 [吲哚环]CH_2 CH（N–H）
4～8	^+H_3N-R-Coo^-	0.2	
<4	^+H_3N-R-COOH	0.05	

相符的。而凝血样酶在此范围内萤光光谱峰没有位移，可以说明在此pH范围内，凝血样酶中色氨酸侧链周围正负电荷变化不大，即色氨酸残基有个稳定的环境。

凝血样酶的最适pH为7.4，这与Ouyang等人的报道是一致的。图9 还给出了有意思的结果，凝血样酶的活性变化伴随着萤光强度强弱变化，在pH7.4时达到最大值。考虑到凝血样酶在表现其最大活性时可能有一最适构象，这种最适构象利于能量吸收传递及再发射。

凝血样酶热稳定较好。在65°C保温30分钟仍有60%的酯酶活力。温度的变化在凝血样酶萤光光谱上没有发现突变情况，随着温度升高，色氨酸的萤光光谱成直线下降。凝血样酶的变温曲线也与此相接近。只是凝血样酶的升温与降温恢复曲线不能重迭。可以看出，在此条件下，它的构象不能完全可逆。

许多研究者的工作表明，凝血样酶不被肝素所抑制，我们的结果也证明了这个事实。同时表明在肝素加入后，凝血样酶的萤光强度基本不变。

参 考 文 献

〔1〕 Esnouf, M. D. and Tunnch, G.W. *Brit. J. Haemat.*, 1967, 13, 581.
〔2〕 Markland, F.S. *Methods in Enzymology*. 1976, 45(B), 229.
〔3〕 Toom, D.M. et al. Characterization of a nonproteolytic arginine ester-hydrolyzing enzyme from Snake venom. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 2549.
〔4〕 Weber, K. and Osborn, M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chen.*, 1969, 244, 4406.
〔5〕 莽克强等：《聚丙烯酰胺凝胶电泳》1975，84页，科学出版社。
〔6〕 徐洵、许贞玉：中国科学技术大学学报 1980，10（3）。
〔7〕 Ouyang C. et al. *Thrombo. Diath. haemorrh*. 1971, 26, 224.

志谢：本文照片由安徽省医研所钟明光同志协助拍摄，氨基酸组成由上海生化研究所陈志明，徐玥同志协助测定，安徽祁门蛇伤所提供蛇毒在此一并致谢。

PURIFICATION, PROPERTIES AND FLUORESCENCE SPECTRA OF THE THROMBIN-LIKE ENZYME OF *AGKISTRODON ACUTUS* VENOM

Wang Chun Cui Tao Liu Jin Huang Wan-Zhi Lu Zi-Xian*
(Department of Biology, University of Science and Technology of China Hefei)

ABSTRACT

Xu Xun et. al. have separated *A. acutus* venom into 12 fraction using DEAE-sephadex A-50. The 10th fraction has been proved to possess the activity of thrombin-like. The further separation of the fraction into two bands which, though not well resolved, both have the activity of thrombin-like was achieved by gel filtration on Sephadex G-75 or DE-52. Polyacrylamide gel electrophoresis indicated that both of them were homogeneous. They have a molecular weight of about 30,000 as estimated from the electrophoresis on SDS-gel. Their immunodiffusion spectrum showed no cross-line of precipitation, indicating their properties were similar to each other. Their optimum pH and isoelectric point were at 7.4 and near 4 respectively.

We also studied the intrinsic fluorescence spectrum of fraction 2. Its spectra in neutral buffer was different from that of bovine thrombin, suggesting the conformational difference between pH 2—9 showed no peak shift in reference to that of Trp. Its activity varied with the change in the strength of fluorescence. The curve of the strength of fluorescence of thrombin-like ploted against the temperature resembled that of Trp. The insensitiveness of the strength of the fluorescence of thrombin-like to the addition of heparin demonstrated that the activity of thrombin-like can not be inhibited by heparin.

* Permament address, Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica.